

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets<sup>6</sup>: A61K 31/725</p>		A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 95/26736 (43) Date de publication internationale: 12 octobre 1995 (12.10.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00398 (22) Date de dépôt international: 29 mars 1995 (29.03.95)</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>	
<p>(30) Données relatives à la priorité: 94/03803 30 mars 1994 (30.03.94) FR</p>		<p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): UNIVERSITE PARIS VAL DE MARNE [FR/FR]; 61, avenue du Général-de-Gaulle, F-94010 Créteil Cédex (FR).</p>			
<p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BARRITAULT, Denis [FR/FR]; 4, rue Française, F-75001 Paris (FR). CARUELLE, Jean-Pierre [FR/FR]; 32, rue Jules-Joffrin, F-94100 Saint-Maur (FR). DESGRANGES, Pascal [FR/FR]; 273, boulevard Voltaire, F-75011 Paris (FR). GAUTRON, Jean [FR/FR]; 12, rue Antoine-Bourdelle, F-94400 Vitry-sur-Seine (FR). MEDDAHI, Anne [FR/FR]; 23, square Edison, F-94000 Créteil (FR).</p>			
<p>(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé &amp; Phélie, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).</p>			
<p>(54) Title: USE OF BIOPOLYMERS FOR THE MUSCLE TREATMENT (54) Titre: UTILISATION DE BIOPOLYMERES POUR LE TRAITEMENT DES MUSCLES (57) Abstract The use of at least one polymer or biopolymer known as HBGFPP, capable of specifically protecting growth factors of families FGF and beta-TGF from trypsin damage, for preparing a drug for treating muscle tissue, is disclosed. (57) Abrégé Utilisation d'au moins un polymère ou d'un biopolymère, appelés HBGFPP, protégeant spécifiquement les facteurs de croissance des familles des FGF et TGF bêta de la dégradation trypsique, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des tissus musculaires.</p>			

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TC	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Utilisation des biopolymères pour le traitement des muscles.

La présente invention a pour objet  
5 l'utilisation de polymères ou de biopolymères pour la préparation d'un médicament pour le traitement de lésions de toutes origines affectant le muscle squelettique ou le muscle cardiaque en médecine humaine ou vétérinaire et des compositions pharmaceutiques pour ce traitement.

10 La synthèse des polymères CMDBS (dextrans substitués par des résidus carboxyméthyle, benzylamine et sulfonate) a été décrite dans le brevet FR 2461724 ainsi que dans le brevet US 4 740 594. Certains de ces 15 polymères miment l'héparine et peuvent être utilisés en tant que produits de remplacement de l'héparine du plasma, grâce à leurs propriétés anticoagulante et anticomplément.

20 Parmi l'ensemble des polymères CMDBS, certains de ces polymères miment une autre propriété de l'héparine qui consiste en une stabilisation, une protection et une potentialisation de l'activité biologique *in vitro* des facteurs de croissance de la famille FGF (Tardieu et coll, *Journal of Cellular Physiology*, 1992, 150 Pages 194 à 203).

25 Le brevet FR 2 644.066 décrit l'utilisation de certains CMDBS associés aux FGF pour la cicatrisation de la peau et de la cornée. Des expériences ont été réalisées en provoquant une blessure cutanée à l'aide d'un emporte pièce de 6 mm de diamètre chez le rat. Dans cet exemple, le CMDBS associé au FGF 2 permet 30 d'obtenir un effet net sur la vitesse et la qualité de la réparation de la peau.

Un autre biopolymère, le dextrane sulfate a également été proposé en association avec des FGF, comme stabilisateur et protecteur, dans le brevet Japonais N°13890. Le dextrane sulfate est par ailleurs largement utilisé dans des pommades ou crèmes cicatrisantes de la peau ainsi que dans des compositions de collyre, mais n'a aucun effet reporté à la connaissance du demandeur sur la cicatrisation et ou la régénération de lésions musculaires.

Un autre agent, le sucrose sulfate ester et son sel d'aluminium le sucralfate sont des produits décrits et utilisés seuls ou associés aux FGF comme agents de traitement des ulcères et lésions du tractus digestif (Brevet US N°3.432.489 et Brevet US N°5.202.311) .

Les tissus musculaires squelettique et/ou cardiaque sont particulièrement riches en facteurs de croissance et plusieurs auteurs ont décrit la présence et/ou l'action des FGFs et TGFs bêta dans et sur les cellules myoblastiques (par exemple: D.Gospodarowicz et Cheng , In Vitro Cellular and Developmental Biology 1987 23(7):pp. 507-514 ; Groux -Muscatelli B., Bassaglia Y , Barritault D. , Caruelle J.P. et Gautron J. Dev.Biol. 1990 , 142:pp380 -385 ; Johnson S. et Allen R Exp.Cell Res. 1990 , 187 : pp 250-254 ; Dayton W. et Hathaway M. Poult Sci 1991 70: pp 1815-1822 ) ainsi que leur extraction à partir de muscles squelettiques ou cardiaques (par exemple Morrow et coll. J.Clin..Invest. 1990 , 85 : pp 1816-1820 ; Padua R et E.Kardami Growth Factor , 1993 , 8 : pp 291-306 ; Parker T et Scheinder M ; Annu. Rev. Physiol. 1991 53 :pp 179-200 ; Casscells W et coll. Ann N.Y. Acad. Sci

1990, 593 :pp 148-161).

L'action cicatrisante des facteurs FGF dans des lésions du muscle cardiaque induites par création d'ischémie a été décrite (Yanagisawa-Miwa et coll. 5 Science 1992, 257 : pp 1401-1403).

10 Franco (US 4.378.347) a aussi décrit l'utilisation d'aFGF pour traiter en particulier des ischémies cardiaques. Des billes de dextrane sont utilisées comme excipient dans certaines formulations décrites dans ce brevet.

L'activité de la composition est très clairement imputée au FGF.

15 Il ressort donc de l'analyse de l'état de la technique que des polymères avaient déjà été utilisés en association avec des facteurs de croissance.

Néanmoins, dans aucun des documents cités ces polymères ne présentent des effets en eux-mêmes, c'est-à-dire sans qu'ils soient associés à des facteurs de croissance.

20 En outre, l'activité d'associations polymères-facteurs n'a été décrite que sur certaines lésions d'un type bien précis de tissu, le tissu cutané.

25 Du fait de l'imprévisibilité des effets thérapeutiques d'une molécule donnée, il n'était pas évident que ces polymères puissent avoir un effet sur d'autres tissus que ceux de la peau.

30 En effet, il est bien connu que les différents tissus du corps humain ou animal présentent des spécificités tant structurelles que fonctionnelles qui rendent impossible toute prédition quant à l'effet d'une molécule, connue pour son effet sur le tissu cutané, sur le tissu musculaire.

Ceci est d'autant plus vrai que les tissus musculaires sont très différents de par leur structure et leur origine (mésodermique) des tissus de l'épiderme et de la cornée.

5 De même, il est bien connu qu'il est impossible de prédire l'activité *in vivo* d'une molécule sur un tissu particulier à partir de résultats obtenus *in vitro* sur un modèle expérimental spécifique.

10 De manière surprenante, il a été trouvé, selon l'invention, que certains polymères ont un effet très marqué sur la vitesse de cicatrisation et de régénération des lésions des tissus musculaires squelettiques et/ou cardiaques, ainsi que sur la qualité de cette cicatrisation et/ou régénération 15 telle que l'on peut la mesurer en étudiant par des méthodes histologiques et physiologiques le degré de maturation des fibres musculaires.

20 La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un polymère ou d'un biopolymère, appelés HBGFPP, protégeant spécifiquement les facteurs de croissance des familles des FGF et TGF bêta de la dégradation trypsique et n'inhibant pas de manière significative la coagulation, pour la 25 fabrication d'un médicament pour le traitement des tissus musculaires.

Un tel polymère présente particulièrement une activité anti-coagulante inférieure à 50 unités internationales par mg de polymère mesurée selon Maillet et al (Mol. Immunol, 1988, 25, 915-923). 30 Avantageusement, il potentialise les FGF *in vitro*.

Préférentiellement, il n'active substantiellement pas le système du complément, c'est-

à-dire qu'il possède une activité anti-complément, supérieure à 0,5 µg pour le CH50 (selon Mauzac et al., *Biomaterials*, 6, 61-63, 1985).

5 Selon la présente invention on entend par polymères toutes substances naturelles, naturelles modifiées chimiquement ou totalement synthétiques répondant à la définition donnée ci-dessus.

Ainsi il peut s'agir de :

10 - polymères obtenus à partir de dextrans mais modifiés par d'autres types de substitutions avec d'autres types de radicaux,

- polymères naturels autres que ceux dérivant de dextrans mais comportant des résidus osidiques (cellulose, chitine, fucanes, etc....),

15 - polymères obtenus par polymérisation de monomères de natures non osidiques (poly acide malique, poly acide oxalique, poly acide lactique, polystyrène, polyéthylène glycol) modifiés ou non.

20 Avantageusement, ledit polymère ou biopolymère est un polysaccharide qui peut être composé principalement de résidus glucose.

Un tel polysaccharide présentera préférentiellement un poids moléculaire supérieur à 10 kD et avantageusement proche de 40 kD.

25 Il peut aussi comprendre des résidus glucosamine et/ou d'acide uronique, particulièrement sous la forme de dimère glucosamine-acide uronique.

30 Des polysaccharides particulièrement préférés sont des dextrans substitués, des glycosaminoglycans éventuellement associés à un lipide, un peptide ou un protide ou des sulfates de ces polymères.

La présente invention est en outre relative à

une composition pharmaceutique contenant de ces polymères.

Les polymères et/ou biopolymères peuvent être sélectionnés à partir de substances naturelles qui peuvent ensuite être éventuellement modifiées par additions de groupements chimiques appropriés ou encore obtenus entièrement par synthèse. Ces polymères naturels, semi synthétiques ou entièrement synthétiques sont ensuite sélectionnés sur la base de leurs capacités à interagir spécifiquement avec plusieurs facteurs de croissance notamment ceux de la famille des FGF et des TGF bêta. Ils sont également sélectionnés sur leurs capacité à protéger ce ou ces facteurs contre des dégradations protéolytiques. Ces polymères seront désignés sous le sigle générique de HBGFPP (heparin binding growth factor protectors and promoters).

Deux prototypes de ces polymères ou bio polymères sont donnés comme exemples ainsi que les procédés et critères de sélection de ces polymères.

Le premier exemple de HBGFPP appartient à la famille des CMDBS qui sont des produits connus, à savoir des dextrans biospécifiques fonctionnalisés, substitués par des résidus carboxyméthyle, benzylamide et benzylamine sulfonate. Ces polymères illustrent l'obtention de HBGFPP à partir de produits naturels (dextrans) subséquemment chimiquement substitués.

Le deuxième exemple décrit la sélection de produits complètement naturels comme les protéoglycosaminoglycannes sulfates purifiés à partir d'extraits tissulaires.

Ces deux exemples illustrent les capacités de

ces HBGFPP à interagir, à stabiliser, à protéger et à potentialiser les facteurs de croissances des familles FGF et TGF bêta et leur utilisation dans une composition pharmaceutique permettant une cicatrisation et une régénération des cellules musculaires squelettiques ainsi qu'une protection et cicatrisation des cellules musculaires cardiaques.

On entend, dans la présente demande, par traitement, toute opération curative ou préventive effectuée pour la prophylaxie et la cicatrisation de lésions de tissus musculaires.

Grâce à l'action des HBGFPP et notamment des CMDBS comme l'illustrent les exemples décrits ci-dessous, la réorganisation musculaire est accélérée, alors que l'architecture du muscle, c'est à dire le nombre de fibres par faisceau organisé dans le cas du muscle squelettique n'est pas modifiée de façon significative. Dans le cas du muscle cardiaque le nombre de myocytes détruits après la lésion provoquée par ischémie est très inférieur à celui que l'on peut dénombrer après traitement par les HBGFPP. (Résultats corroborés par la diminution du nombre de fibroblastes et de fibres de collagènes dans les coeurs traités au HBGFPP). Ces résultats illustrant l'effet cytoprotecteur des HBGFPP.

Un médicament ou une composition pharmaceutique selon l'invention contient une quantité efficace de HBGFPP par exemple du CMDBS associée à un ou plusieurs véhicules compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Elle peut être également associée à des agents pharmaceutiques comme des anti-inflammatoires, ou antibactériens, et pour le muscle cardiaque, des

5 antiarythmiques, des anticoagulants ou des agents thrombolytiques. Le véhicule peut être du sérum physiologique ou des tampons tels que le PBS contenant NaCL 0.15 Molaire ou toute autre sorte de solution compatible et non irritante pour le tissus musculaire lésé. Des formulations permettant d'obtenir des 10 solutions pâteuses ou en gel selon les techniques courantes connues de l'homme de l'art peuvent être proposées selon le type et l'accessibilité de la lésion.

15 Avantageusement, un tel médicament est conçu pour être directement injectable par voie intramusculaire à une dose de 25 à 2500 ug/ml de HBGFPP comme le CMDBS dans les exemples donnés ou comme les biopolymères naturels HBGFPP tels le mesoglycanes mais la voie intraveineuse constitue une autre voie d'administration. Outre ses qualités de 20 protecteur des facteurs de croissance "Heparin Binding" ; les HBGFPP sélectionnés selon les tests décrits ci-dessous présentent une très faible activité anticoagulante, par rapport à celle de l'héparine, trop faible pour perturber la coagulation dans le cas d'un traumatisme musculaire. Dans le cas d'une 25 injection par voie intraveineuse la dose injectée doit être rapportée au volume sanguin de l'homme ou de l'animal ainsi traité pour que la dose de HBGFPP dans le sang soit également comprise entre 25 à 2500 µg /ml.

30 A titre d'exemple d'application des médicaments selon l'invention, on peut citer les atrophies et /ou dystrophies musculaires, congénitales ou acquises, et plus particulièrement :

- les maladies génétiques : comme les myopathies (Duchennes, Becker), Dystrophies des ceintures, etc...
- les maladies où il y a atonie musculaire
- 5 - les accidents médicamenteux iatrogènes (traitement à la chloroquine ou injections d'anesthésique locaux en intra musculaire ),
- les accidents traumatiques : comme ceux des sportifs élongation, déchirure, claquage, hématomes et
- 10 autres, les lésions induites par des blessures ou lors d'actes chirurgicaux,
- les agressions virales ou bactériennes , par exemple le virus du polyome,
- les atrophies musculaires induites par des
- 15 immobilisations ,
- les ischémies musculaires périphériques comme celles générées par les artériopathies oblitérantes périphériques des membres,

Pour le muscle cardiaque les lésions générées

20 par diminution et suppression de l'irrigation sanguine peuvent être prévenues ou diminuées par l'utilisation de la composition de l'invention. Ainsi dans le cas d'infarctus du myocarde, l'injection dans le muscle infarcit de la composition ou son injection par voie

25 intraveineuse permettant l'accès des HBGFPP dans le territoire cardiaque lésé.

Dans le cas de transplantation cardiaque la

survie des cellules cardiaques peut être favorisée par

30 adjonction de médicament ou de composition selon la présente invention , de même que dans le cas de cardio myoplasties .

Dans les insuffisances cardiaques générées lors

des maladies héréditaires comme celle de Duchène ou de Becker ou encore dans les myocardiopathies liées aux infections virales, parasitaires ou bactériennes.

Un avantage de l'invention est que  
5 l'utilisation d'une dose unique de la composition, procure le résultat escompté, c'est à dire, la régénération complète des fibres musculaires squelettiques comme la préservation des myocytes cardiaques.

10 Un autre avantage concernant les lésions des tissus musculaires est que l'on favorise également la revascularisation du muscle lésé.

15 A titre d'exemples décrits dans les pages suivantes et concernant le muscle squelettique, une injection unique de 25  $\mu$ l à 50  $\mu$ g/ml de CMDBS sur le site de la blessure induit une régénération complète des fibres musculaires après 7 jours alors que dans le muscle témoin rien de tel n'est observé. Le nombre de fibres par unité de surface dans la coupe histologique  
20 transversale est 10 fois supérieur par rapport à un témoin non traité au CMDBS.

25 Il est à noter que ni l'héparine, ni le dextrane sulfate ne présentent des propriétés sur la régénération musculaire. Bien que ces molécules interagissent avec les FGFs et tout au moins en ce qui concerne l'héparine avec le TGF bêta, ni la sucrase, ni l'héparine, ni le dextrane sulfate ne protègent le TGF bêta contre la protéolyse induite par l'action de la trypsine ainsi que le montrent l'application des tests de criblages et de sélection des HBGFPP décrits dans les exemples ci-dessous. Ainsi en procédant à un criblage *in vitro* sur la base d'une protection double.

des FGFs et des TGFbêta contre l'action de la protéolyse induite par la trypsine il est possible de sélectionner des HBGFPP comme certains CMDBS dont ceux donnés dans ces exemples Ces mêmes critères de 5 sélection appliqués à des biopolymères naturels comme le mésoglycan ou le sulodexide ont permis de montrer que le mesoglycane, qui présente une double activité de protection et de stabilisation pour à la fois les FGF et les TGF bêta, présente une activité favorisante 10 pour la réparation et régénération musculaire, fait partie de la famille des HBGFPP, alors que le sulodexide qui protège les FGF contre la protéolyse induite par l'action de la trypsine n'a pas d'action protectrice significative contre l'action de la 15 trypsine sur les TGF bêta.

L'invention sera illustrée, sans être aucunement limitée par les exemples qui suivent, dans lesquels:

La figure 1 représente la formule du CMDBS.

20 La figure 2 illustre la potentialisation de l'activité biologique des FGF1 (2a) et FGF2 (2b) par l'héparine, le mesoglycane et le sulodexide. La mesure de l'activité biologique est effectuée sur des cellules CCL39 par la mesure de l'augmentation de 25 l'incorporation de thymidine tritiée en fonction de la dose de FGF1 et de FGF2 ajoutée seule ou en présence de 20 µg d'héparine , de 10 µg de mésoglycan ou de 10 µg de sulodexide.

30 Les figures 3 et 4 illustrent l'effet protecteur de l'héparine, du mésoglycan et du sulodexide contre une dégradation thermique du FGF1(3) et FGF2(4). Les échantillons de FGF sont incubés seuls

ou en présence de 20 µg d'héparine , de 10 µg de mésoglycan ou de 10 µg de sulodexide à 20°C (a) et 37°C (b) pendant 1, 7, 15, 30 jours. La mesure de l'activité biologique présentée en abscisse correspond 5 aux valeurs des unités de stimulation (ED50) de l'incorporation de thymidine tritiée dans des cellules CCL39.

La figure 5a illustre l'effet protecteur de 10 l'héparine, du mesoglycane et du sulodexide contre une dégradation protéolytique du  $^{125}\text{I}$ -FGF1. La digestion 15 protéolytique a été effectuée à 37°C et les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 18 %. Les gels sont séchés et autoradiographiés. La première piste contient le  $^{125}\text{I}$ -FGF1 seul, dans la deuxième (piste 2) le  $^{125}\text{I}$ -FGF1 est 20 incubé en présence de trypsine et d'héparine (piste 3), de mesoglycane (piste 4) ou de sulodexide (piste 5).

La figure 5b illustre l'effet protecteur de 25 l'héparine, du mesoglycane et du sulodexide contre une dégradation protéolytique du  $^{125}\text{I}$ -FGF2. La disposition des pistes est identique à celle présentée pour le  $^{125}\text{I}$ -FGF1 en 5a.

Les figures 6A et 6B sont des profils d'élution 30 sur colonne de DEAE-Trisacryl respectivement des fractions HSM (Fig. 6A) et HSS (Fig. 6B), en présence de fractions chondroïtines sulfates (CSA) pour le calibrage de la colonne.

Les figures 7, 8, 9 et 10 correspondent à des 35 montages microphotographiques d'une hémicoupe transversale de muscle, après 8 jours de régénération, traités (figures 8 et 10) ou non (figures 7 et 9) par

le CMDBS.

Les figures 10A à 10D représentent des électrocardiogrammes de rats non opérés (10A et 10B) et de rats opérés (11C et 11D).

5 Les figures 12A à 12F représentent des photographies de coupes histologiques de coeurs de rats traités par du sérum physiologique (12A et 12D), traités par du CMDBS (12B et 12E) et de rats témoins (12C et 12F).

10 EXEMPLE 1

Préparation et sélection des CMDBS

a) Préparation des CMDBS

15 Les CMDBS sont des dextranes substitués par des groupements carboxyméthyle, benzylamide et benzylamide sulfonate. La méthode de synthèse des CMDBS peut être celle décrite par M.MAUZAC et J.JOSEFONVICZ dans Biomaterials 1984, 5, 301-304. Selon ce procédé, le carboxyméthyle dextrane (CMD) est préparé à partir de dextrane par substitution de quelques unités 20 glycosylées avec des groupes carboxyliques sur le carbone en position 5 ou 6. Dans une deuxième étape, la benzylamide est couplée aux groupes carboxyliques pour former le carboxyméthyl-benzylamide dextrane (ou CMBD). Enfin quelques noyaux aromatiques du 25 benzylamide sont sulfonés pour aboutir au carboxyméthyle dextrane benzylamide sulfonate ou CMDBS.

30 Les sels de sodium de ces dérivés sont ultrafiltrés, lyophilisés et dissous dans le tampon approprié avant utilisation.

La formule générale des CMDBS est illustrée sur la figure 1.

Les CMDBS possèdent une distribution statistique des différents substituants. Les pourcentages pour chaque type de CMDBS sont déterminés par les méthodes classiques.

5 b) Sélection des CMDBS

i: Tests de protection et de stabilisation des FGFs

Lors de la synthèse des CMDBS il est possible de contrôler le taux de substitution de chacun des groupements par modification des conditions de la réaction de substitution. Le contrôle des paramètres comme la température, le temps de réaction, les concentrations relatives des constituants et le nombre de réaction de substitution etc... permettent d'obtenir un très grand nombre de polymères substitués. La substitution des hydroxyles par le carboxyméthyl sur les carbones en positions 5 et 6 permet d'obtenir des taux de carboxyméthylation allant de 0 à 200% (100% pour chacun des carbones en position 5 et 6). Le groupement carboxyméthyl peut être à son tour partiellement ou totalement utilisé pour la fixation de la benzylamide. Les groupes benzylamides peuvent être partiellement ou totalement utilisés pour la sulfonation. Les dextrans substitués fonctionnalisés utilisés selon l'invention sont parmi ceux spécialement décrits dans le brevet français n°2.461.724. Outre la capacité à stabiliser et protéger les facteurs de croissance de la famille FGF comme décrit dans la publication de Tardieu et coll J.Cell.Physio.1992 150 p 194 à 203 ; et dans le brevet Français N°2.461.724; le CMDBS sélectionné doit pouvoir interagir avec au moins un membre de la famille des facteurs de croissance de la famille TGF

bêta selon une méthode d'évaluation décrite ci-dessous et protéger les TGFbêta contre une protéolyse.

ii. Evaluation des capacités d'interactions entre CMDBS et facteurs de croissance de la famille TGF bêta.

Afin de mesurer la capacité de certains CMDBS à interagir avec les membres de la famille TGF bêta et de par cette interaction protéger les TGF bêta, un test de criblage a été établi. Ce test consiste à mesurer la capacité du CMDBS sélectionné à permettre au TGF bêta de garder son activité biologique malgré un traitement protéasique.

Dans l'exemple ci-dessous le CMDBS utilisé est le lot 26.2 défini par un taux de substitution de 110% de motifs carboxyméthyles, 3,6% de motifs benzylamides et 36,5% de motifs sulfonates et possède une activité anti-coagulante de 4 UI/mg (Unités Internationales). L'activité anti-complément de ce lot est de 1,1 µg de CH50, mesurée selon Mauzac et al (précédemment cités).

L'héparine utilisée comme témoin provient des établissements Sanofi.(Institut Choay) et présente une activité anticoagulante de 175 UI/mg

Le TFG bêta est préparé à partir de plaquettes sanguines humaines selon le protocole décrit dans de nombreuses publications et couramment utilisés par l'homme de l'art ( par exemple dans la publication Growth Factors and their Receptors 1992 , vol 1 pages 419-472 par A. Roberts et M. Sporn édité par A. Roberts et M. Sporn et publiée par Springer Verlag Berlin. Le test d'activité biologique du TGF bêta utilisé dans cet exemple est celui de l'inhibition de croissance des cellules CCL64 (provenant de l'American Tissue

Culture Collection). Cette inhibition est mesurée par la capacité du TGF bêta à inhiber l'incorporation de Thymidine tritiée d'une manière dose dépendante dans ces cellules CCL64 stimulées par le facteur de croissance FGF ou par du sérum de veau foetal selon le protocole décrit par Van Zolen dans *Progress in Growth Factor Research, 1990*, 2 p131 à 152.

Le TGF bêta est utilisé à deux doses, l'une correspondant à la capacité d'inhibition de 50% de l'incorporation de Thymidine tritiée (définie comme l'unité d'activité inhibitrice) l'autre, correspondant à la capacité d'inhibition de 100%. Dans cet exemple les valeurs obtenues sont de 250 pg de TGF bêta pour obtenir l'unité d'activité d'inhibition sur les cellules CCL64 cultivées dans 1 ml de milieu de culture. Le 100% d'inhibition est obtenu avec 1ng de TGF bêta dans 1 ml de milieu de culture.

20 Un échantillon de 50ng de TGF bêta dans du tampon phosphate salin contenant 0.1% de sérum albumine bovine (provenant de la Société SIGMA à Saint Louis USA) est incubé seul, ou associé soit à 5000 µg de CMDBS, soit à 5000µg d'héparine, avec ou sans 500 µg de trypsine. Le volume final de la solution incubée est ajusté à 1 ml et l'incubation est effectuée à 37°C durant un temps variable (10 minutes dans l'exemple 25 décrit ( tableau 1 ).

30 Des échantillons d'un volume de 20 µl de chacune des réactions d'incubation sont prélevés et ajoutés aux cellules CCL64 cultivées dans des plateaux de 24 puits contenant chacun un millilitre de milieu de culture selon le protocole décrit par E.Zohlen mentionné ci dessus. Dans ces conditions la

concentration finale de TGF bêta par puits est de 1ng/ml. Le tableau 1 résume les résultats obtenus dans diverses conditions et montre l'effet protecteur du CMDBS. Ainsi après 10 mn d'incubation à 37°C, 75% de 5 l'activité biologique du TGF bêta est encore présente, alors que l'héparine qui pourtant peut se fixer au TGF bêta (Mac Caffrey et al., J. of Cell Physiology, 1992, vol. 52, 430-440) ne protège pas le TGF bêta contre cette dégradation protéolytique (il reste moins de 20% 10 d'activité biologique). Il est à rappeler que dans le cas des FGFS l'héparine assure une protection contre la protéolyse induite par la trypsine.(Tardieu et al., Journal of Cellular Physiology, 1992, 150: 194-203).

Il a été vérifié que le CMDBS n'avait pas de 15 pouvoir inhibiteur sur l'activité de la trypsine (tableau 2). Ainsi, 10 µg de trypsine ont été incubés soit avec un substrat (S.87 fourni par la société Serbio, Paris et utilisé selon les recommandations de ce fournisseur) ou soit avec ce substrat et un 20 inhibiteur de la trypsine tel celui provenant du soja (comme le Soyabean trypsin inhibitor ou STI de chez Sigma) ces incubations étant faites en l'absence ou en présence de quantités variables de CMDBS (lot AM26). L'activité enzymatique de la trypsine a été mesurée 25 par absorption spectrophotométrique du produit de transformation du S 87 en fonction du temps d'incubation.

EXEMPLE 2:

Sélection d'autres HBGFPP

30 Deux préparations commerciales de protéoglycosamino- glycane et glycosaminoglycane ont été sélectionnées selon leurs capacités à interagir

avec les facteurs de croissance de la famille du FGF ainsi qu'avec ceux de la famille du TGF bêta.

Des préparations d'héparane sulfate obtenues par fractionnement du mésoglycan et du sulodexide ont 5 d'autre part est testées.

Le mésoglycan et le sulodexide ont été fournis par la Société Sigma Chemical Co , Saint Louis MO USA précédemment cités.

Les cellules utilisées dans cet exemple sont 10 les cellules CC139 qui proviennent de l'American Tissue Culture Collection. Les conditions de culture et de tests de mesure d'activité biologique des FGFs sont les mêmes que celles décrites dans la publication Tardieu et coll J.Cell.Physiol. 1992. Leurs propriétés 15 sont résumées dans le tableau 3. Les facteurs de croissance FGF utilisés sont les formes recombinantes FGF1 et FGF 2.

a) Effet du mésoglycan et sulodexide sur l'activité biologique des FGFs in vitro.

20 Dans ces expériences le FGF1 ou 2 est utilisé à une dose correspondant à la dose efficace (notée ED50) pour induire une stimulation de l'activité biologique de 50% de la dose induisant la stimulation maximale .L'activité biologique est mesurée par la capacité 25 d'induire une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules selon les protocoles largement décrits dans de nombreuses publications dont celle de Tardieu et coll mentionnée précédemment et également dans le brevet français N°2 30 644 066. Dans cet exemple l'ED50 est de 5 ng/ml pour le FGF1 et de 3 ng/ml pour le FGF 2, valeurs mesurées expérimentalement (Figs.2a et 2b). La même expérience

de stimulation en fonction de la dose de FGF est effectuée en présence de 10 µg/ml de Mesoglycan ou de Sulodexide ou 20 µg/ml d' Héparine. La figure 2 montre que dans ces conditions l'ED50 devient 0.4 ng/ml et 5 0,2 ng/ml respectivement pour les FGF1 et FGF2 en présence de ces doses de mésoglycan ou d'Héparine. Outre cette capacité à potentialiser l'activité 10 biologique des FGFs les HBGFPP protègent les FGFs contre les dégradations thermiques ainsi que contre l'inactivation induite par l'action protéolytique de la trypsine.(Figs. 3 à 5). De la même manière ces HBGFPP protègent FGF1 et 2 contre une inactivation induite par l'activité protéolytique de la trypsine (Figs. 5a et 5b).

15 b) Effets protecteurs du mésoglycan, sulodexine, du dextrane, du dextrane sulfate et de la sucrase vis-à-vis des TGF bêta.

Plusieurs autres composés ont été évalués: le 20 dextrane sulfate (Sigma Chemical, de poids moléculaire 40.000, le dextrane ayant servi à la synthèse du CMDBS également de chez Sigma) de la sucrase ou sucrose octasulfate (fournie par D. Bar Shalom, Société Bukh Medic, Danemark. Certains de ces composés ont été 25 choisis car ils protègent et stabilisent les FGF. Ainsi, la sucrase (se conférer au brevet US N° 520 2311) ou le dextrane sulfate (se conférer au brevet japonais n° 1 38907/88). Le dextrane est celui qui a servi à la synthèse du CMDBS AM26.

30 L'expérience de protection de l'activité biologique des TGFbêta a été réalisée de la même manière qu'avec les CMDBS ainsi que décrit dans l'exemple 1 ii: Le mélange d'incubation contient 50 ng

de TGF bêta (dans 0,1 % d'albumine sérique de bovin) et de la trypsine (500 µg). Le mésoglycan ou le sulodexide ou le dextran sulfate ou le dextran ou la sucrase sont utilisés à la dose de 5000 µg.

5 L'activité biologique du TGFbêta est mesurée comme décrit ci-dessus après une dilution de 50 fois et en utilisant des cellules CCL64.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

10 Ces résultats illustrent qu'à l'exception de certains CMDBS capables de répondre aux deux critères de sélection vis-à-vis des FGF et TGFbêta seul, parmi les autres composés testés, le mésoglycan présente une activité protectrice significative pour les TGFbêta.

15 c) Isolement de la fraction Héparane Sulfate du Sulodexide et du Mésoglycan

Le Sulodexide et le Mésoglycan correspondent à des mélanges de plusieurs substances dont l'essentiel est constitué de différents glycosaminoglycans (GAG).

20 Par une première étape de purification, il a été établi qu'un gramme de produit sec de chacun de ces deux produits contenait respectivement 874 mg pour le mésoglycan et 795 mg pour le sulodexide de GAG totaux.

25 Ces produits solubilisés à une chromatographie échangeuse d'ions (DEAE - Trisacryl) pour enlever tous les contaminants protéiques. Les GAG totaux ont alors été purifiés en éluant le gel de DEAE avec une solution d'acétate de sodium, pH 4, contenant 1,5 M NaCl.

30 Après une phase de dialyse extensive contre de l'eau, 60 mg de chaque produit de GAG ont été digérés.

par la chondroïtinase ABC pendant une nuit à 37°C ( 1 unité par mg de GAG). Cette enzyme dégrade tous les GAG à l'exclusion des héparanes sulfates (HS). Les produits de digestion ont été soumis à une chromatographie sur tamis moléculaire (G50 Sephadex, colonne de 1,8 x 95 cm). L'élution est ensuite réalisée en tampon bicarbonate d'ammonium sous un débit de 18 ml/h. Le matériel non digéré qui correspond à des GAG de nature HS est collecté dans le volume mort d'élution de la colonne.

Les concentrations en GAG sont calculées à partir de leur contenu en acide uronique par la méthode au carbazole (Bitter T. et Muir H.M., 1962, Anal. Biochem 4, 330-334).

Ces dosages ont permis de préciser la composition suivante de chacun des produits:

	Sulodexide	Mésoglycan
GAG totaux	79 %	87 %
Fraction Héparane Sulfate (HS)	48 %	52 %
Autres GAG	31 %	35 %

Les fractions HS de chacun de ces deux produits ont été chromatographiées à nouveau sur un gel de DEAE Trisacryl. 1 mg de chaque fraction HS, purifiée à partir du mésoglycan (Fig. 6A) ou du sulodexide (Fig. 6B), dans 3 ml a été déposé sur une colonne équilibrée avec du tampon 0,05 M NaCl, 0,05 M TMS-HeI pH 7,5. Après un lavage de la colonne par 10 volumes du même tampon suivi d'un lavage par 10 volumes d'un tampon 0,05 M NaCl, 0,05 M d'acétate de sodium pH 4, le matériel fixé à la colonne est désorbé par un gradient salin allant de 0,05 M NaCl à 1,5 M NaCl dans le même tampon acétate. 1 ml de chaque fraction collectée a

étété dosé par la méthode au carbazole.

Le matériel correspondant aux constituants HS de chacun des produits d'origine présente approximativement le même profil d'élution et donc à peu près la même charge apparente. Ce maximum du pic d'élution est obtenu pour une concentration saline de 0,94 M NaCl. Une fraction définie de chondroïtine sulfate (CSA) a été soumise au même protocole en vue de calibrer la chromatographie. Cette fraction CSA qui ne contient qu'un groupe sulfate par disaccharide est élué à la force ionique de 0,72 M NaCl.

10 Ces résultats montrent que la fraction HS contient plus de groupements sulfates que les CSA de référence. La fraction HS présente environ deux groupes sulfates par unité dissacharidique.

15 Ces fractions ont été testées pour connaître leur pouvoir protecteur vis-à-vis du TGF  $\beta$  et du FGF en comparaison des pouvoirs établis avec les produits bruts respectifs.

20 Evaluation semi-quantitative des effets protecteurs du FGF par différents polymères.

25 Comme décrit ci-dessus, une quantité constante de FGF radioactif est incubée dans des conditions différentes. Après autoradiographie des produits de la réaction, la quantité de FGF radioactif non dégradé est quantifiée par densitométrie. Les valeurs correspondent au pourcentage de FGF radiomarqué retrouvé par rapport à la quantité déposée en début de réaction. (Tableau 5).

30 Les résultats des tableaux 4 et 5 montrent que les fractions HSM et HSS issues respectivement du mésoglycan et du sulodexide présentent des effets

protecteurs supérieurs à ces deux compositions et proches de 100%.

5 EXEMPLE 3: Effets inhibiteurs in vitro des CMDBS et des glycosaminoglycane sur l'activité de l'élastase leucocytaire et sur la plasmine.

Les pouvoirs d'inhibition de différents CMDBS et de leurs composés intermédiaires de leur synthèse, ont été établis pour l'élastase leucocytaire et la plasmine.

10 L'élastase leucocytaire purifiée a été obtenue par Elastin Products Co (Owenville, MO, USA) et la plasmine chez SIGMA.

15 L'inhibition des activités enzymatiques par ces différents composés est effectuée à 37°C dans un bain thermostaté. Les enzymes considérées sont mises en solution dans un tampon Tris-HCL 100 mM, pH8 pour l'élastase et pH 7,4 pour la plasmine, en présence de 0,02% d'azide de sodium et de 0,01% Triton X100 pour la plasmine. Les concentrations des substrats et 20 celles des enzymes sont : 0,10 mM MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (paranitroanilide) pour l'élastase à 8,3 nM et 0,20 mM dVal-Leu-dLys-pNA pour la plasmine à 77 nM. Pour chacune des conditions est établi l'IC50.

25 Le tableau 6 donne les résultats obtenus dans lesquels, le lot AM6 correspond à un dextrane T40 de 40 000 kD. Le lot EM5 correspond à un dextrane T10 de 10 000 kD. Les produits intermédiaires de synthèse sont répertoriés d'après les sigles désignés ci-dessus indexés d'un numéro qui précise le nombre de chacune 30 des réactions de substitution.

Les valeurs des IC50 démontrent que les CMDBS ont des effets inhibiteurs de type hyperbolique non.

compétitif sur l'activité de l'élastase leucocytaire comparables à ceux de l'héparine, l'un des meilleurs inhibiteurs de cette activité (Ki de l'ordre de 1 nM). Les CMDBS exercent de plus et à l'inverse de l'héparine des effets inhibiteurs sur la plasmine.

5 Il ressort en outre du tableau 6 que les effets inhibiteurs des fractions HSM et HSS sont supérieurs à ceux du mésoglycan et du sulodexide, respectivement.

Exemple 4 .  
10 Régénération de muscles squelettiques après écrasement simple.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

15 L'expérimentation a été effectuée sur sept rats Wistar âgés de deux mois et demi et pesant trois cent grammes .

20 Après anesthésie par l'éther , les muscles EDL (muscles des pattes postérieures de rat) ont été dégagés de la loge antérieure de la jambe et lésés mécaniquement par application d'une pression constante sur toute la longueur du muscle à l'aide d'une pince de Péan. La pression est maintenue pendant quinze secondes , la pince étant fermée au deuxième cran. L'homogénéité de la lésion sur la totalité du muscle a été contrôlée en suivant son infarcissement pendant 25 trente secondes . Le muscle a été ensuite replacé dans sa loge et la peau suturée par du fil de lin.

30 Les muscles EDL ont reçu une injection unique de 200  $\mu$ l de CMDBS ou de sulfate de dextrane (DS) à 50  $\mu$ /ml dilués dans le PBS sans calcium ni magnésium . Les témoins de régénération ont reçu une injection de la même quantité de PBS seul . Selon les expériences , l'injection a été pratiquée avant ou après la lésion

du muscle . Les 200  $\mu$ l ont été injectés en une minute et la diffusion du produit a été assurée en laissant en place le muscle pendant deux minutes avant de le replacer dans sa loge . Cinq muscles EDL ont été 5 traités par le CMDBS et deux par le sulfate de dextrane .

Les muscles traités et témoins ont été prélevés après huit jours de régénération, puis congelés immédiatement à -150°C dans l'isopentane . Des coupes 10 transversales à congélation de 10  $\mu$ m d'épaisseur ont été effectuées dans la région médiane du muscle . Les coupes séchées ont été colorées par le trichrome de Gomori .

15 L'analyse morphométrique du nombre de fibres et de leur diamètre a été effectuée sur des montages micrographiques correspondant à une hémi-coupe transversale de muscle .

#### RESULTATS:

20 Lors du prélèvement des muscles après 8 jours de régénération, l'examen macroscopique montre une différence d'aspect entre ceux qui ont été traités par le CMDBS et ceux qui n'ont reçu qu'une injection de PBS. Les muscles traités ont un aspect rouge foncé alors que les témoins ont une coloration beaucoup plus 25 claire . Cette différence suggère dans le premier cas, une vascularisation plus riche et un taux de myoglobine plus élevé . Par ailleurs, le diamètre des muscles injectés par le CMDBS est nettement augmenté ( voir tableau 7 ) ; ils occupent toute la loge 30 antérieure de la jambe et ils refoulent le muscle tibial antérieur vers l'extérieur .

Les figures 7 à 10 correspondent à des montages

microphotographiques d'une h̄emi-coupe transversale de muscle EDL apr̄s 8 jours de r̄génération traités ou non par le CMDBS. Le muscle traité (figure 8) présente un plus grand nombre de fibres r̄générées (F) et d'un diamètre plus élevé que le muscle non traité (figure 7) . L'injection unique de CMDBS au moment de la lésion induit également une meilleure reconstruction du muscle : les faisceaux musculaires , séparés par le conjonctif du périmysium (C) , sont bien différenciés dès le 8ème jour (figure 9 non traité et figure 10 traité au CMDBS). Dans la régénération normale , ce stade de re- construction n'est atteint qu'après trois semaines . L'examen histologique des coupes montre également une plus grande vascularisation et un degré de réinnervation plus élevé.

Les résultats sont identiques que l'injection du muscle EDL ait été pratiquée avant ou après la lésion.

Les données du tableau 7 montrent que l'effet du CMDBS est très important sur la vitesse de régénération ( nombre de fibres r̄générées en 8 jours ) et sur leur degré de maturation (diamètre moyen des fibres ) . La réorganisation du muscle est également nettement accélérée ( nombre de faisceau organisés). Par contre, l'architecture du muscle ( nombre de fibres par faisceau) n'est pas modifiée de façon significative .

L'injection de sulfate de dextrane, dans les mêmes conditions que celles du CMDBS, n'induit aucune modification qualitative et quantitative de la régénération musculaire .

EXEMPLE 5:

Régénération d'un muscle squelettique après désinnervation puis écrasement.

5 Etude comparative de différents HBGFPP et autres glycosaminoglycans non HBGFPP.

L'expérimentation est effectuée sur 18 rats Wistar mâles âgés de deux mois et demi et pesant environ 300 grammes.

10 Le protocole est rigoureusement identique à celui de l'exemple 4 avec cependant préalablement à l'écrasement du muscle, section du nerf moteur à l'entrée du muscle.

Les substances sont en solution de tampon phosphate saline (PBS).

15 L'injection a lieu après déinnervation et écrasement à l'aide d'une microseringue de 50 µl munie d'une aiguille flexible de 60 mm de longueur et de 0,4 mm de diamètre. Deux injections sont effectuées à 2 minutes d'intervalles. Le volume injecté est donc de 20 100 µl. La sucrase (glucose octyl sulfate) a été fournie gracieusement par D. Bar Shalom Bulk Medic Danemark.

25 Après sacrifice de l'animal, les muscles EDL de la patte traitée et de la patte controlatérale sont pesés. Les variations individuelles du poids des muscles normaux d'animaux de même âge pouvant atteindre 20%, les résultats ont été standardisés en calculant le rapport du muscle traité à son témoin intact controlatéral.

30 Ce ratio pour les muscles traités par le PBS seul a été considéré comme 100 %. Le degré de régénération des muscles traités par les différentes

substances a été calculé en % du muscle injecté par le PBS . Les résultats sont exprimés dans le tableau 8.

5 Ces résultats démontrent l'effet spécifique des HBGFPP dans la régénération musculaire. En effet, seuls certains CMDBS et le mésoglycan, qui montrent un effet protecteur et promoteur à la fois pour les FGF et les TGFbêta, induisent une régénération significative ( 190% et 133 % respectivement).

Exemple 6:

10 Cicatrisation du muscle cardiaque

Les expériences réalisées lors de la cicatrisation du myocarde infarcie sont effectuées chez le rat.

15 Le rat représente un bon modèle expérimental par rapport à d'autres espèces animales car, comme pour l'homme , il n'existe pas de circulation collatérale entre les coronaires droite et gauche.

protocole expérimental :

20 Des rats Wistar (Wi/Wi Ico, IFFA CREDO, France), de sexe mâle, pesant 350 g, sont anesthésiés au pentobarbital sodique par voie intra-péritonéale.

Les rats sont rasés au niveau du thorax et du cou, et un électrocardiogramme (ECG) est pratiqué en préopératoire.

25 Une trachéotomie permet de mettre le rat sous ventilation assistée, et de lutter contre le pneumothorax per opératoire et de diminuer la mortalité per et post opératoire.

30 Après installation du rat en décubitus latéral droit et mise en place d'un petit billot sous le thorax, une thoracotomie latérale gauche (à un travers de doigt au-dessus des côtes flottantes ce qui

correspond au 4-5ème espace intercostal gauche) est pratiquée. Le cœur est mis à jour et le péricarde est incisé, le ventricule gauche est repéré et l'artère coronaire gauche est ligaturée à son origine avec un 5 fil PROLENE 6/0. Une minute après, la zone infarcie est visible et l'enregistrement de l'activité électrique cardiaque permet de visualiser les ondes de Pardie témoin de la réalisation de l'infarctus.

On injecte en plein milieu de la région 10 infarcie, en un seul point, à l'aide d'une seringue de Hamilton, 10 $\mu$ l d'une solution à 50  $\mu$ g/ml de CMDBS préparée dans du sérum physiologique ou 10  $\mu$ l de cette même solution ne contenant pas de CMDBS.

Le thorax est alors refermé, le pneumothorax 15 est aspiré, et la ventilation assistée est laissée en place jusqu'au réveil complet de l'animal. Un dernier ECG est réalisé.

Les électrocardiogrammes (ECG) des rats avant 20 et après infarctus au niveau de la dérivation sont représentés sur la figure 11. Les traces A et B montrent deux types d'électrocardiogramme qui peuvent être rencontrés chez les rats non opérés. Les traces C et D sont les ECG de ces mêmes rats en postopératoire. Il existe un sus décalage très net du segment ST 25 signant l'infarctus.

Les rats retenus pour l'expérimentation, seront 30 ceux qui présentent au moment de la fermeture du thorax, les signes électriques typiques de l'infarctus du myocarde, les autres animaux seront éliminés de l'étude.

Après examen des ECG, 33 rats seront sacrifiés aux jours 7, 15 et 30 post opératoire et un ECG sera

réalisé avant l'euthanasie. Une étude histologique est pratiquée sur les coeurs infarcies.

5 Les résultats histologiques sont présentés sur la Fig.12 qui illustre l'étude histologique au 15ème jour postopératoire des coeurs de rats infarctés par ligature de l'artère coronaire gauche et coloration au trichrome de Masson.

10 Figures 12A et 12D (injection de 10 $\mu$ l de sérum physiologique au milieu de la zone infarcie). On constate l'existence d'un infarctus sous endocardique siégeant au niveau de la paroi du ventricule gauche (12A). Celle-ci est atrophiée et il existe une importante réaction inflammatoire en périphérie ainsi qu'une fibrose intense. La figure 12D (x25) visualise 15 le milieu de l'infarctus. On constate l'existence d'une atrophie importante marquée par l'apparition d'une fibrose et la disparition totale des fibres myocardiques, il existe quelques cellules inflammatoires.

20 Figures 12B et 12E : Traitement de l'infarctus avec du CMDBS (10  $\mu$ l d'une solution à 50  $\mu$ g/ml sont injectés dans la zone infarcie). L'infarctus est également sous endocardique et siège au niveau du ventricule gauche, la zone atrophiée est moins étendue 25 et il existe au niveau des fibres myocardiques intactes (12B). La figure 12E (x25) montre des zones vasculaires nombreuses, des fibres myocardiques apparemment intactes dans un environnement fibreux

30 Figures 12C et 12F: photographies d'un cœur témoin.

Il parait évident que la taille du ventricule gauche est conservée au niveau de la paroi des coeurs

traités au CMDBS, les coeurs de la série témoin présentent des parois plus fines et une zone infarcie plus étendue. Il existe au niveau des coeurs infarcis traités au CMDBS des zones de régénération du myocarde.

TABLEAU 1  
Effets protecteurs du CMDBS et de l'héparine  
à l'encontre de la dégradation du TGF bêta par la trypsine

mélange d'incubation à 37°C pendant 10min et contenant par millilitre selon l'indication: CMDBS ou Héparine (5000 µg); $\beta$ TGF (50 ng); Trypsine(500 µg)	% d'activité inhibitrice de l'incorporation de thymidine tritiée dans des CCL64 (après dilution du mélange d'incubation de 50 fois.)
Tampon d'incubation seul	0
CMDBS (5000 µg)	0
Héparine (5000 µg)	0
Trypsine (1000 µg)	0
TGF bêta (50 ng)	100
$\beta$ TGF + CMDBS (batch AM26)	100
$\beta$ TGF + Héparine	100
$\beta$ TGF + Trypsine	5
$\beta$ TGF + CMDBS+Trypsine	7.5
$\beta$ TGF + Héparine + Trypsine	10

TABLEAU 2Effet non inhibiteur du CMDBS vis-à-vis de la trypsine

Trypsine (10 µg/ml) + S87	100
Trypsine + S87 + 5µg/ml CMDBS	100
Trypsine + S87 + 50 µg/ml CMDBS	100
Trypsine + S87 + 500 µg/ml CMDBS	100
Trypsine + S87 + STB1	0

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

TABLEAU 3 :

Origine , activité anticoagulante et composition  
partielle du mésoglycan et du sulodexide  
(informations du fournisseur)

	Sulodexide	Mésoglycan
5	Origine	duodenum de porc
10	Activité anticoagulante	50-70 IU/mg
	Composition chimique	
15	Dermatane sulfate	20-35%
	Chondroitine Sulfate	2-7%
	Héparane sulfate	+
		+

TABLEAU 4  
Protection du TGFbêta par divers polymères

5	TGF bêta	100 %
	TGF bêta + trypsine	0 %
	TGF bêta + mésoglycan	100 %
	TGF bêta + mésoglycan + trypsine	50 %
	TGF $\beta$ + HSM	100 %
	TGF $\beta$ + HSM + trypsine	75 %
	TGF beta + sulodexide	100 %
	TGF beta + sulodexide + trypsine	20 %
	TGF $\beta$ + HSS	100 %
	TGF $\beta$ + HSS + trypsine	45 %
	TGF bêta + Dextrane	100 %
	TGF bêta + Dextrane + trypsine	0 %
	TGF bêta + Dextrane Sulfate	100 %
	TGF bêta + Dextrane Sulfate + trypsine	0 %
	TGF bêta + Sucrase	100 %
	TGF bêta + Sucrase + trypsine	0 %

HSM = Héparanes Sulfates purifiés à partir du Mésoglycan

HSS = Héparanes Sulfates purifiés à partir de Sulodexide

TABLEAU 5  
Protection du FGF par divers polymères

		PROTECTION EN %
	FGF seul	100
5	FGF + Trypsine	0
	FGF + Trypsine + Héparine	100
	FGF + Trypsine + Mesoglycan	75
	FGF + Trypsine + Sulodexide	70
	FGF + Trypsine + Mesoglycan traité	0
10	Heparinase	
	FGF + Trypsine + Sulodexide traité	0
	Héparinase	
	FGF + Trypsine + Héparine Traité	0
	Héparinase	
15	FGF + HSM + Trypsine	95
	FGF + HSS + Trypsine	90

TABLEAU 6  
Inhibition des activités de l'élastase et de  
la plasmine

5

	Composés testés	Elastase Leucocytaire		Plasmine
		IC50 en µg/ml	IC50 en µg/ml	
10	CMDBS lot AM6	2,2		1,5
	T40	> 100		> 100
	CMDBS lot EMS	10		7
	T10 CMD2B	50		53
	T10 5CMD1B	> 100		> 100
	T10 3CMD	> 100		> 100
	T10	> 100		> 100
	Mesoglycan	72		65
	HS Mesoglycan	20		22
	Sulodexide	79		75
15	HS Sulodexide	25		20
	Héparine	1,8		
	Lipo-héparine			0,5

HSM = Héparanes Sulfates purifiés à partir du Mésoglycan

HSS = Héparanes Sulfates purifiés à partir de Sulodexide

TABLEAU 7

Données morphométriques des muscles EDL, en coupe transversale, traités ou non par le CMDBS, après 8 jours de régénération

	EDL témoin contralatéral	EDL traité par le CMDBS	EDL traité par le D.S.
Diamètre des muscles en mm	4,1 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,4
Nombre de fibres sur une hémicoupe	519	5523	418
Densité des fibres régénérées (nb/mm <sup>2</sup> )	67,4	639,2	
Diamètre moyen des fibres régénérées	30,16 $\pm$ 2,5	56,4 $\pm$ 3,62	28,2 $\pm$ 4,6
Nombre de faisceaux musculaires par coupe	7	15	
Nombre de fibres par faisceau	67,7 $\pm$ 7	75 $\pm$ 14	

TABLEAU 8

5

Effets de différents polymères sur la régénération de muscles désinnervés

10

15

20

Substances:poids injecté	Ratio du régénéré régénéré/ controlatéral intact	% ratio traité/ratio dégénéré
PBS	0.705	100
CMDBS (10 µg)	1.342	190
Sucrase (10 µg)	0.620	87
Héparine (10 µg)	0.590	86
Sulodexide (10 µg)	0.638	90.7
Mésoglycane (10 µg)	0.940	133

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polymère ou d'un biopolymère, appelés HBGFPP, protégeant spécifiquement les facteurs de croissance des familles des FGF et TGF bêta de la dégradation trypsique et n'inhibant pas de manière significative la coagulation, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des tissus musculaires squelettiques ou cardiaques.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polymère ou biopolymère présente une activité anti-coagulante inférieure à 50 unités internationales par mg de polymère.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ledit polymère n'active实质iellement pas le système du complément
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit polymère potentialise *in vitro* les FGF.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit polymère inhibe实质iellement les activités protéasiques de l'élastase et/ou de la plasmine.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polymère ou biopolymère est un polysaccharide.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est principalement composé de résidus glucose.
8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le polysaccharide comprend des résidus glucosamine et/ou d'acide uronique.
9. Utilisation selon la revendication 8,

caractérisée en ce que le polysaccharide comprend des dimères glucosamine-acide uronique.

10. Utilisation selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée en ce que ledit polysaccharide 5 est un protéoglycosaminoglycane ou un glycosaminoglycane, ou un sulfate d'un de ces composés.

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est 10 un dextrane substitué.

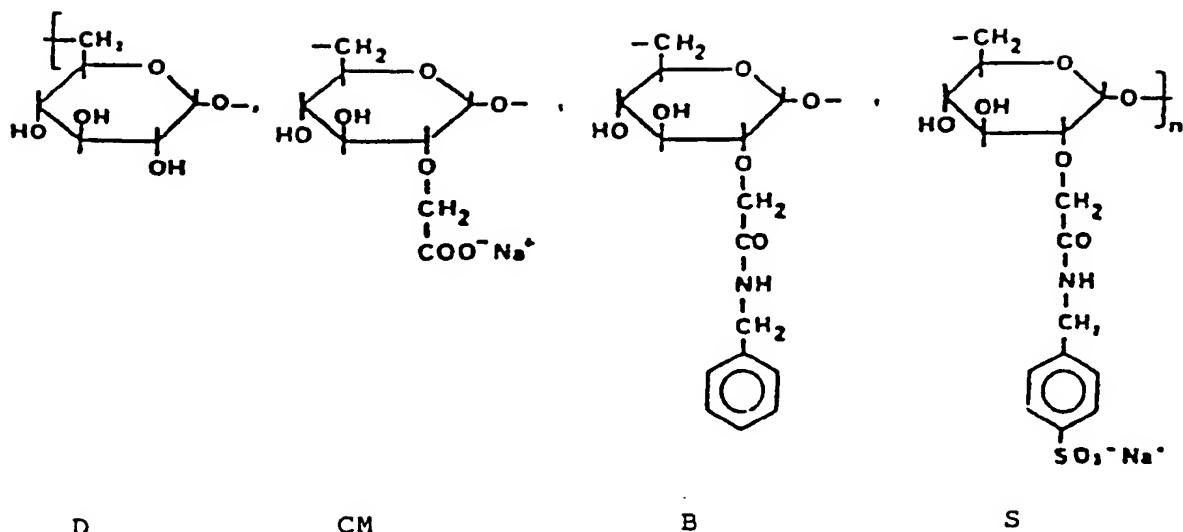
12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un CMDBS.

13. Utilisation selon l'une des revendications 15 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polymère est de nature non-osidique.

14. Utilisation ou composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le tissu musculaire est celui des muscles cardiaques ou 20 squelettiques.

15. Composition pharmaceutique pour la cicatrisation des tissus musculaires squelettiques ou cardiaques contenant au moins un polymère tel que défini dans l'une des revendications 1 à 11 en 25 association avec au moins un excipient pharmacologiquement acceptable.

FIG. 1



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

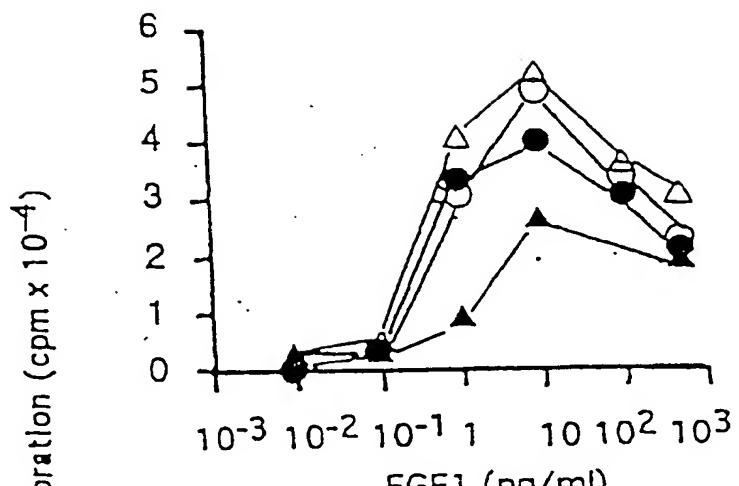


FIG. 2 A

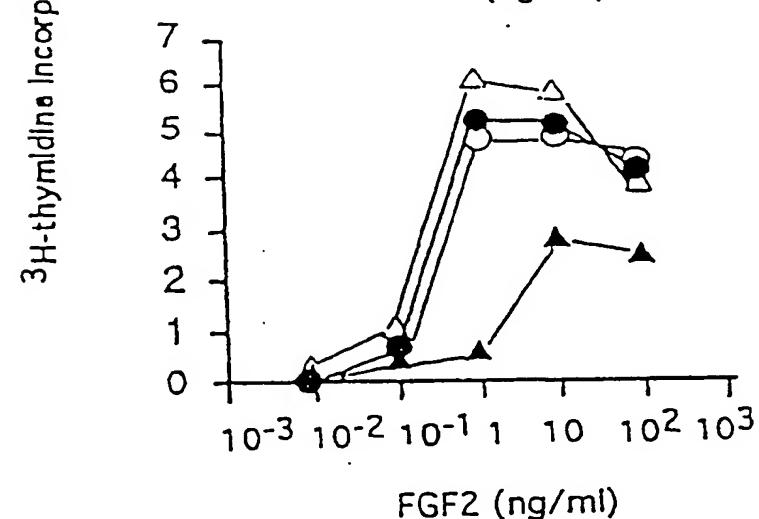


FIG. 2 B

- ▲ FGF
- FGF plus héparine
- FGF plus mésoglycane
- △ FGF plus sulodexide

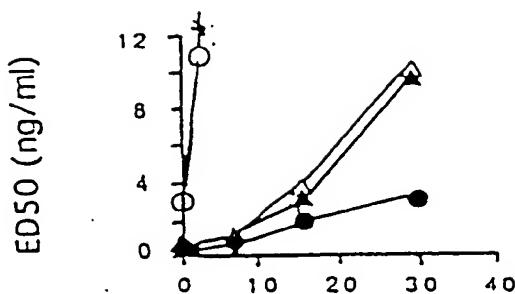


FIG. 3 A

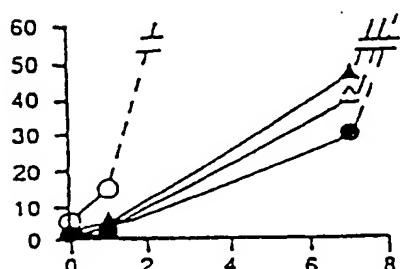


FIG. 3 B

- FGF<sub>1</sub>
- FGF<sub>1</sub> plus héparine
- ▲ FGF<sub>1</sub> plus mésoglycane
- △ FGF<sub>1</sub> plus sulodexide

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

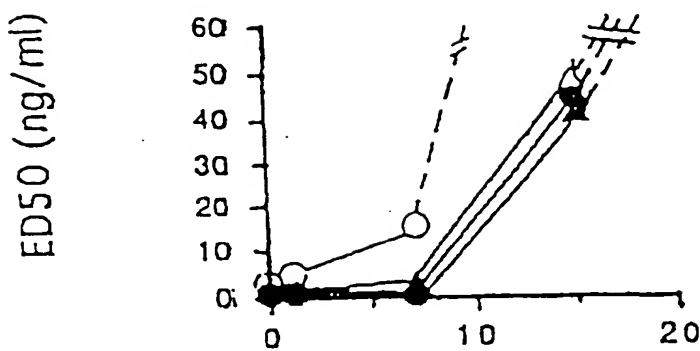


FIG. 4 A

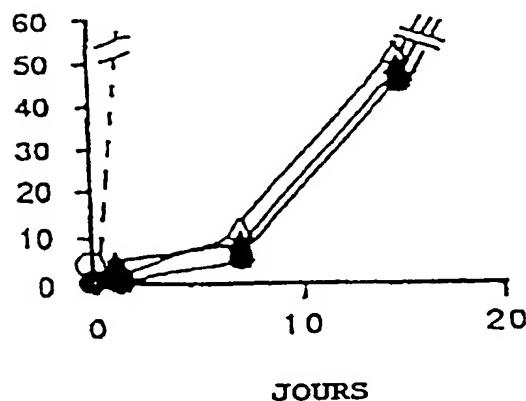


FIG. 4 B

- △ FGF<sub>2</sub>
- FGF<sub>2</sub> plus héparine
- ▲ FGF<sub>2</sub> plus mésoglycane
- FGF<sub>2</sub> plus sulodexide

FIG. 5 A

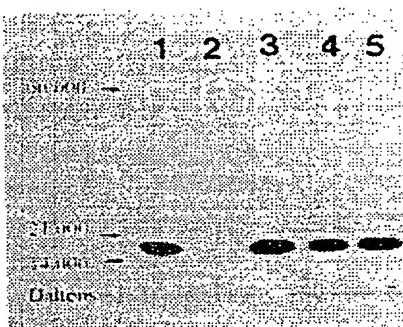
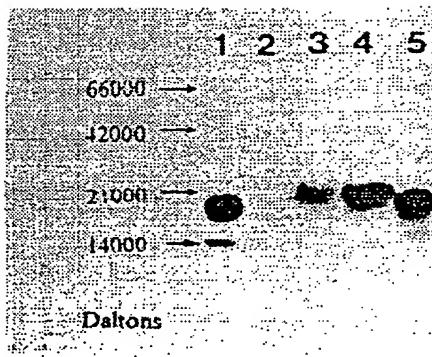


FIG. 5 B



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG. 6A

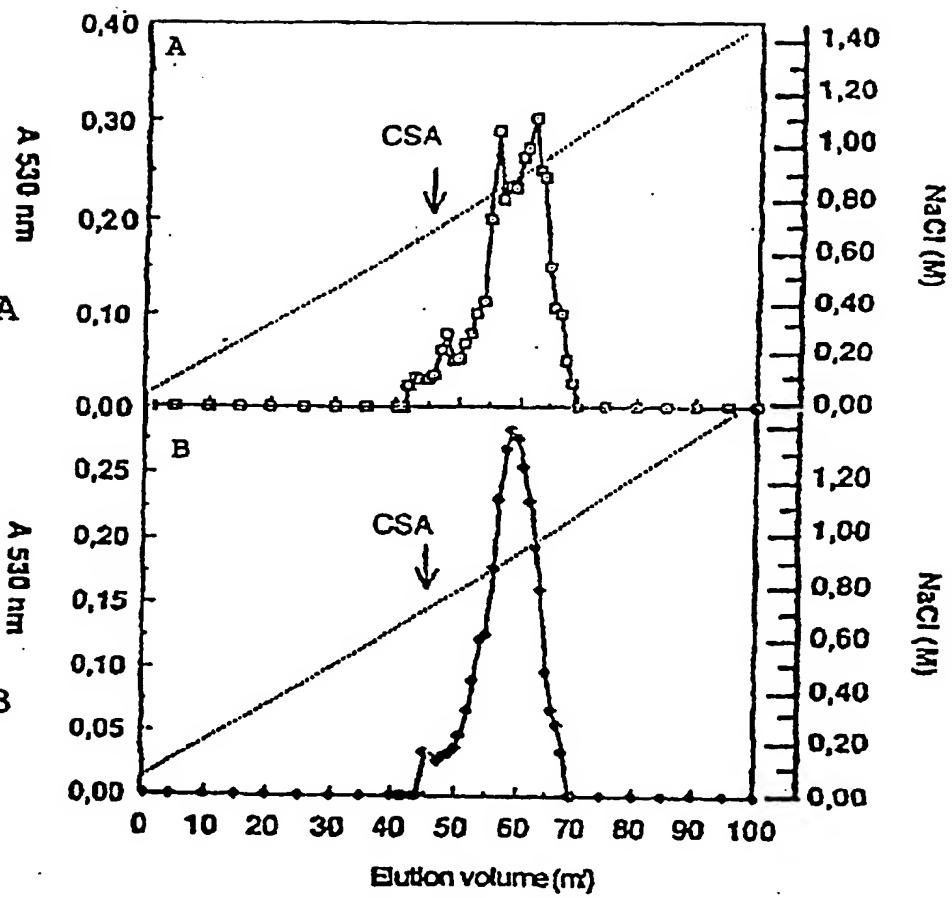


FIG. 6B

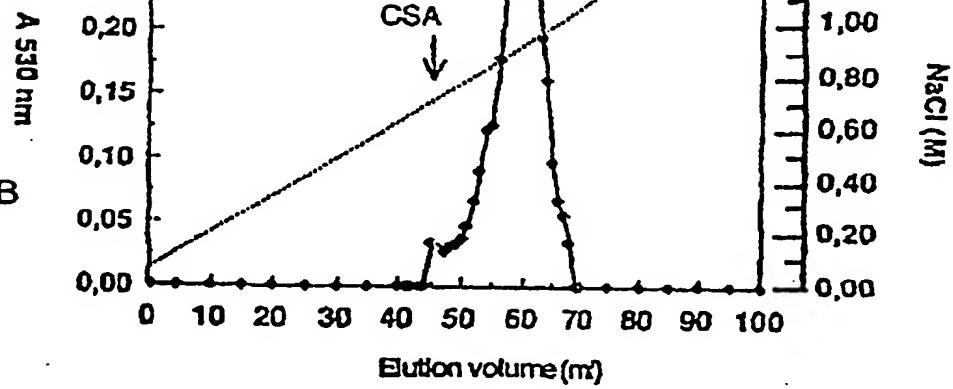
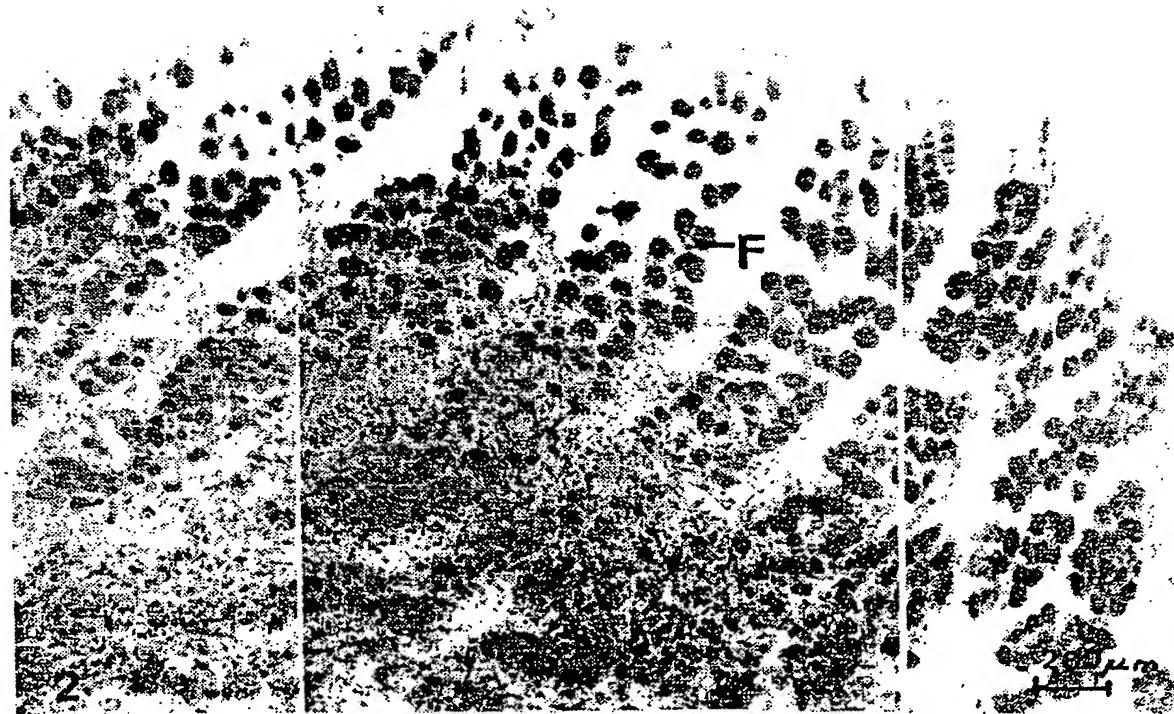


FIG. 7



FIG. 8



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

FIG. 9

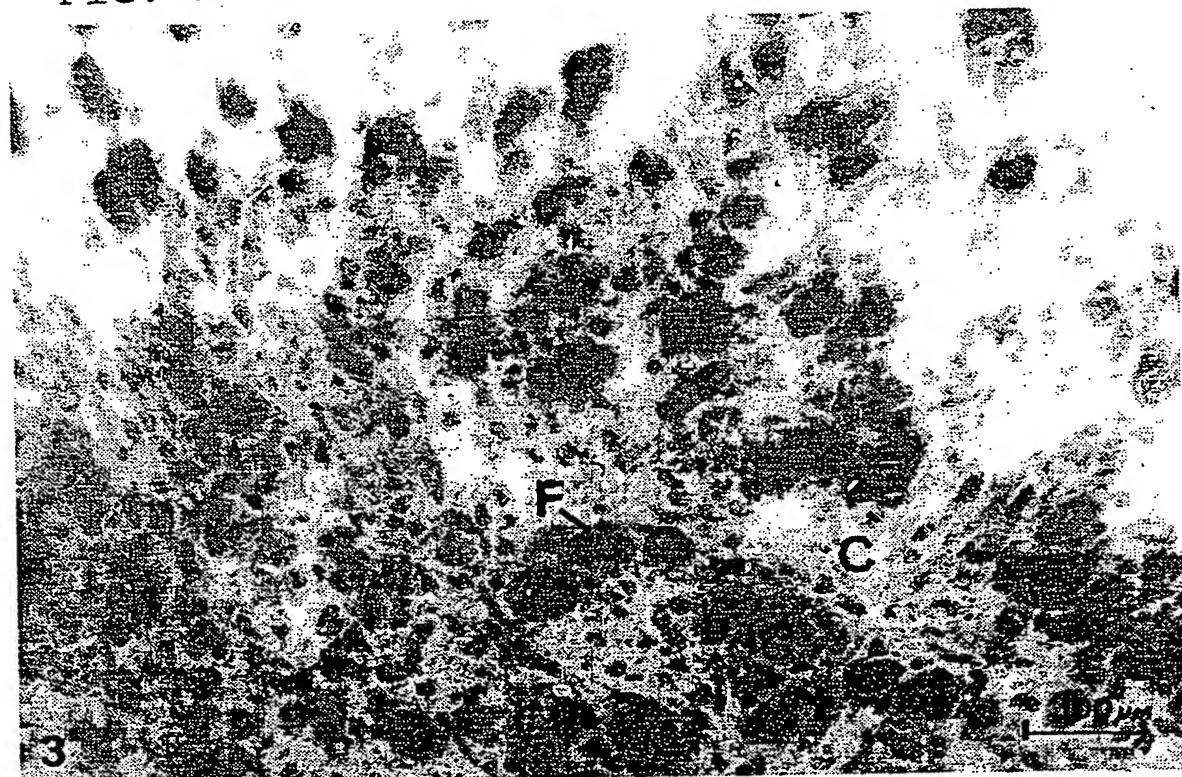
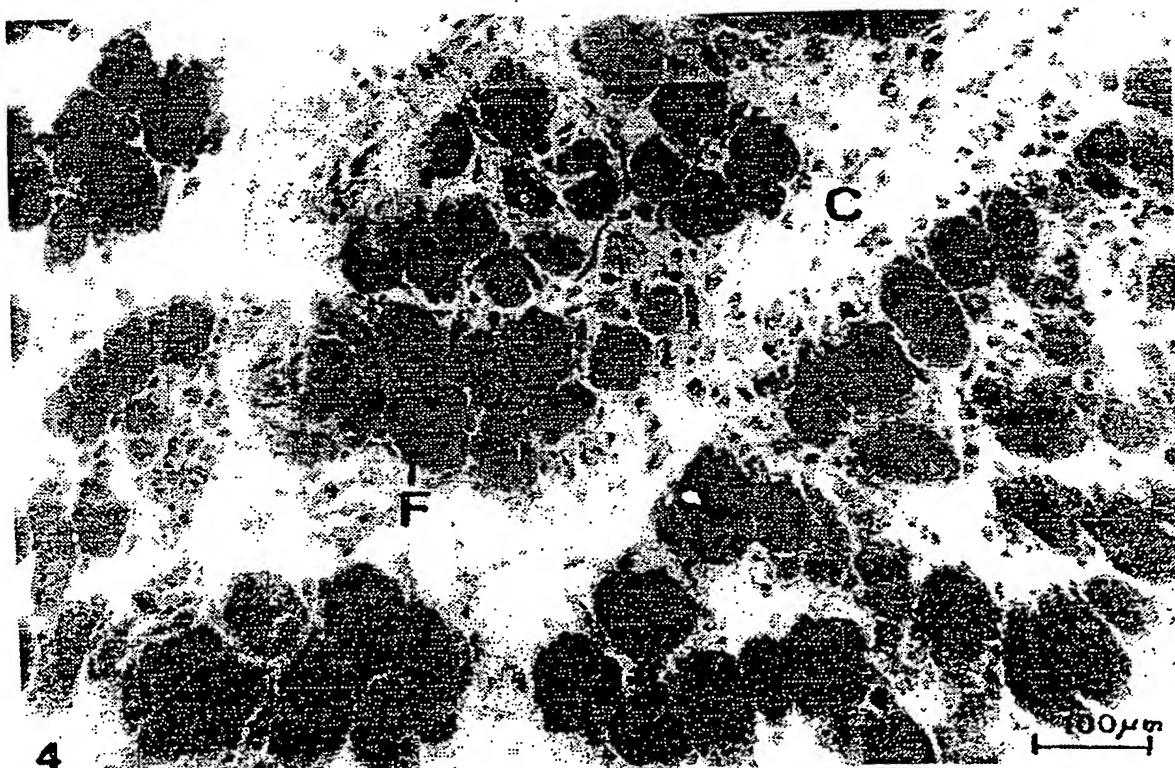


FIG. 10



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG. 11A

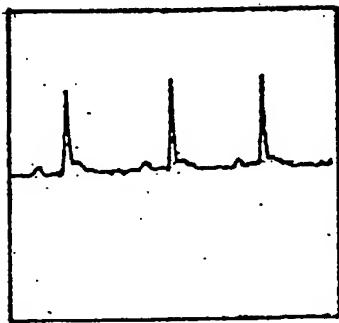


FIG. 11B

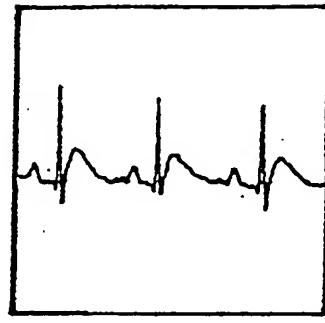


FIG. 11C

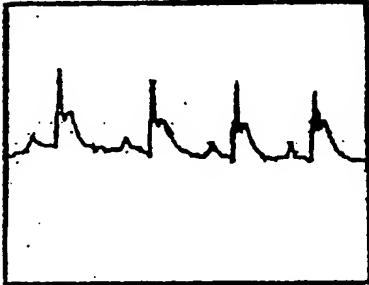
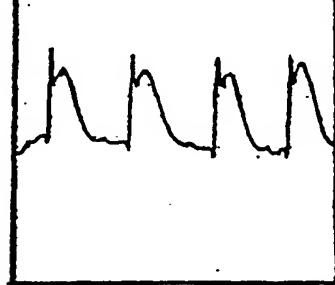


FIG. 11D



FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

FIG. 12A



FIG. 12B

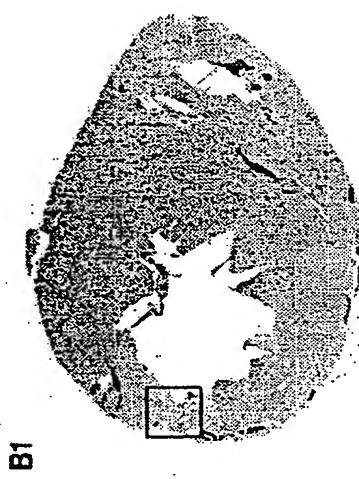


FIG. 12C

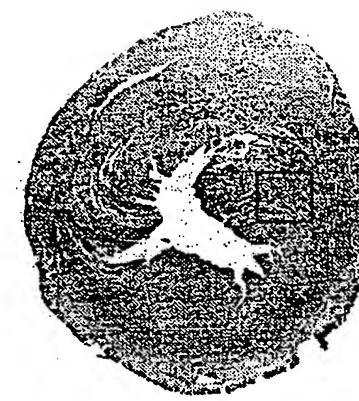


FIG. 12D

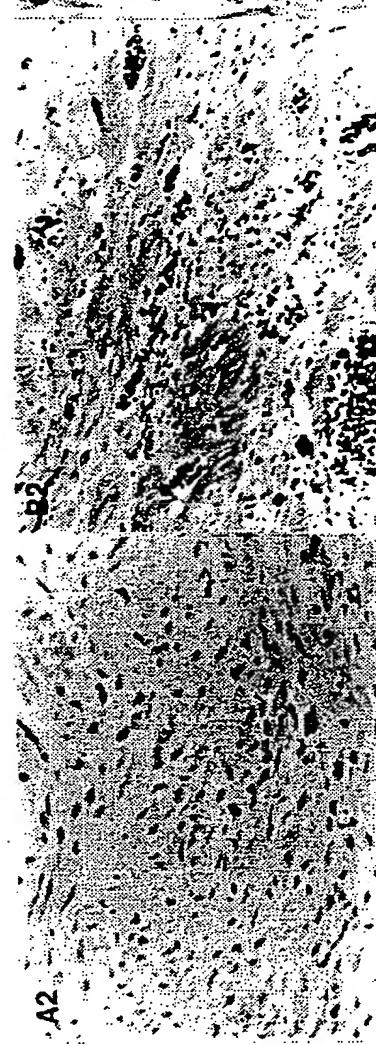
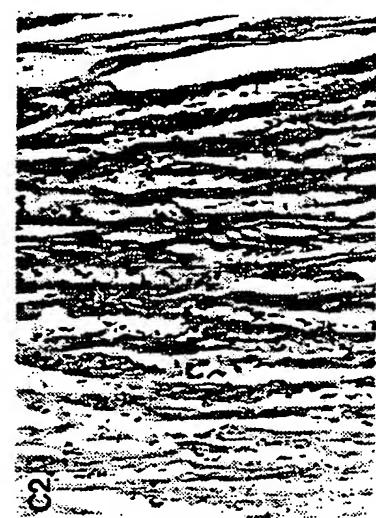


FIG. 12E



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/00398A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K31/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 461 724 (FOUGNOT ET AL) 6 February 1981 cited in the application ---	
A	FR,A,2 644 066 (THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES) 14 September 1990 cited in the application ---	
A	US,A,4 740 594 (MAUZAC ET AL.) 26 April 1988 cited in the application ---	
A	J. BIOMATER. SCI. POLYM. ED., vol. 3, no. 2, 1991 pages 149-154, T. AVRAMOGLOU ET AL. 'Derivatized dextran inhibition of smooth muscle cell proliferation.' ---	
		-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

4 September 1995

Date of mailing of the international search report

14.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/00398

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BIOMATER. SCI. POLYM. ED., vol. 4, no. 5, 1993 pages 431-444, D. LETOURNEUR ET AL. 'Antiproliferative capacity of synthetic dextrans on smooth muscle cell growth: the model of derivatized dextrans as heparin-like polymers,' ---	
A	DEV. BIOL., vol. 126, no. 1, 1988 pages 19-28, E. KARDAMI ET AL. 'Heparin inhibits skeletal muscle growth in vitro.' -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/00398

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR-A-2461724	06-02-81	AT-T- CA-A- EP-A, B EP-A, B JP-B- JP-C- JP-A- US-A-	10748 1188298 0023854 0090100 1040630 1558542 56018877 4755379	15-12-84 04-06-85 11-02-81 05-10-83 30-08-89 16-05-90 23-02-81 05-07-88
FR-A-2644066	14-09-90	AT-T- AU-A- CA-A- DE-D- DE-T- EP-A- ES-T- WO-A- JP-T-	106743 5283890 2048638 69009748 69009748 0462194 2057544 9010456 4505756	15-06-94 09-10-90 10-09-90 14-07-94 22-09-94 27-12-91 16-10-94 20-09-90 08-10-92
US-A-4740594	26-04-88	FR-A- AT-T- CA-A- DE-A- DE-D- DE-T- EP-A, B EP-A- JP-B- JP-A-	2555589 110391 1231334 3485658 3486341 3486341 0146455 0428182 6025202 60135401	31-05-85 15-09-94 12-01-88 21-05-92 29-09-94 04-05-95 26-06-85 22-05-91 06-04-94 18-07-85

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Intern. n° No  
PCT/FR 95/00398

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K31/725

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR,A,2 461 724 (FOUGNOT ET AL) 6 Février 1981 cité dans la demande ---	
A	FR,A,2 644 066 (THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES) 14 Septembre 1990 cité dans la demande ---	
A	US,A,4 740 594 (MAUZAC ET AL.) 26 Avril 1988 cité dans la demande ---	
A	J. BIOMATER. SCI. POLYM. ED., vol. 3, no. 2, 1991 pages 149-154, T. AVRAMOGLOU ET AL. 'Derivatized dextran inhibition of smooth muscle cell proliferation.' ---	
		-/-



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 Septembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14.09.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klaver, T

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 95/00398

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>J. BIOMATER. SCI. POLYM. ED., vol. 4, no. 5, 1993 pages 431-444,</p> <p>D. LETOURNEUR ET AL. 'Antiproliferative capacity of synthetic dextrans on smooth muscle cell growth: the model of derivatized dextrans as heparin-like polymers,' ----</p>	
A	<p>DEV. BIOL., vol. 126, no. 1, 1988 pages 19-28,</p> <p>E. KARDAMI ET AL. 'Heparin inhibits skeletal muscle growth in vitro.'</p> <p>-----</p>	

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Intern. No  
PCT/FR 95/00398

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2461724	06-02-81	AT-T- 10748 CA-A- 1188298 EP-A, B 0023854 EP-A, B 0090100 JP-B- 1040630 JP-C- 1558542 JP-A- 56018877 US-A- 4755379	15-12-84 04-06-85 11-02-81 05-10-83 30-08-89 16-05-90 23-02-81 05-07-88
FR-A-2644066	14-09-90	AT-T- 106743 AU-A- 5283890 CA-A- 2048638 DE-D- 69009748 DE-T- 69009748 EP-A- 0462194 ES-T- 2057544 WO-A- 9010456 JP-T- 4505756	15-06-94 09-10-90 10-09-90 14-07-94 22-09-94 27-12-91 16-10-94 20-09-90 08-10-92
US-A-4740594	26-04-88	FR-A- 2555589 AT-T- 110391 CA-A- 1231334 DE-A- 3485658 DE-D- 3486341 DE-T- 3486341 EP-A, B 0146455 EP-A- 0428182 JP-B- 6025202 JP-A- 60135401	31-05-85 15-09-94 12-01-88 21-05-92 29-09-94 04-05-95 26-06-85 22-05-91 06-04-94 18-07-85

